



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Oncologia Médica

SUBTIPOS MOLECULARES NO CARCINOMA UROTELIAL E A SUA IMPORTÂNCIA NA TERAPÊUTICA NEOADJUVANTE

Ana Catarina Ramos Carrondo Dias de Matos

JULHO 2018



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Oncologia Médica

SUBTIPOS MOLECULARES NO CARCINOMA UROTELIAL E A SUA IMPORTÂNCIA NA TERAPÊUTICA NEOADJUVANTE

Ana Catarina Ramos Carrondo Dias de Matos

Orientado por:

Prof. Doutora Isabel Fernandes

JULHO 2018

Resumo

O cancro da bexiga é um dos cancros mais prevalentes no mundo e uma doença heterogénea. A cistectomia radical com linfadenectomia pélvica é a terapêutica *standard* para o carcinoma da bexiga invasivo localizado, mas 50% dos doentes desenvolvem metástases nos 2 anos seguintes. Recentemente, vários investigadores e instituições classificaram o cancro da bexiga em vários subtipos, de acordo com as suas características moleculares. Estes subtipos parecem ser sobreponíveis, e vários estudos mostraram evidência de que podem estar relacionados com o prognóstico da doença e previsão da resposta à terapêutica neoadjuvante e dirigida. Neste trabalho foi efetuada uma revisão sistemática sobre os diferentes subtipos moleculares no carcinoma da bexiga e como essas características podem ter impacto na terapêutica, com especial foco na terapêutica neoadjuvante. Neste contexto, a evidência sugere que o subtipo molecular *p53-like* implica resistência à QT neoadjuvante com cisplatina e o subtipo basal é o que mostra o maior aumento na sobrevivência global. Por outro lado, o Cluster II da classificação TCGA parece ser o subtipo molecular com maior benefício de imunoterapia (atezolizumab). No entanto, ainda é necessário validar estes resultados em estudos prospetivos, randomizados e com maior numero de doentes.

Palavras-chave: Cancro da Bexiga; Carcinoma Urotelial; Subtipos Moleculares; Terapêutica Neoadjuvante; Prognóstico

Abstract

Bladder cancer is among the most prevalent cancers worldwide, and a highly heterogenic disease. Radical cystectomy with pelvic lymph node dissection is the standard of care for localized muscle invasive bladder cancer. However, 50% of patients develop metastatic disease within 2 years after surgery. Recently, several investigators classified bladder cancer in subtypes according to distinct molecular signatures. These subtypes show overlap, and recent studies showed that they can be related to prognosis and may predict therapeutic response to neoadjuvant chemotherapy and targeted-therapies. This work presents a systematic review about the molecular subtypes of bladder cancer, and how these features can have an impact in treatment, with a special focus in neoadjuvant therapeutics. The evidence suggests that molecular subtype p53-like shows chemoresistance to neoadjuvant chemotherapy with cisplatin, and basal subtype shows most benefit in overall survival, while cluser II of the TCGA classification is the subtype with most benefit for immunotherapy (atezolizumab). To validate these discoveries in clinical practice, prospective and randomized studies with more patients are needed.

Keywords: Bladder Cancer; Urothelial Carcinoma; Molecular Subtypes; Neoadjuvant, Prognostic

Índice

1) Introdução.....	6
2) Caracterização Epidemiológica.....	6
3) Subtipos Moleculares.....	7
1) LUND.....	9
2) MDA.....	10
3) UNC.....	11
4) TCGA.....	11
5) Uromol.....	12
6) Sobreposição de Classificações.....	13
7) Consenso.....	14
4) Quimioterapia no Cancro da Bexiga.....	15
1) Terapêutica do Cancro Da Bexiga.....	15
2) Perspetiva histórica da Quimioterapia no Cancro Da Bexiga.....	16
3) Quimioterapia Neoadjuvante.....	16
4) Prever a Resposta à Quimioterapia Neoadjuvante.....	20
5) Relação dos Subtipos Moleculares com a Terapêutica.....	23
1) Relação com a Quimioterapia Neoadjuvante.....	23
2) Relação com Terapêutica dirigida.....	25
6) Conclusão.....	29

Introdução

O cancro da bexiga é um dos cancros mais prevalentes no mundo. Nas 3 últimas décadas, poucos avanços haviam sido feitos no seu tratamento e compreensão. Esta realidade alterou-se devido ao avanço no entendimento da sua biologia e genética, e à introdução da imunoterapia como alternativa terapêutica. Os estudos moleculares e genéticos mostraram que o cancro da bexiga é altamente heterogêneo e apontam para a existência de assinaturas moleculares que podem prever a progressão da doença e a resposta terapêutica (quimioterapia neoadjuvante e terapêutica dirigida como a imunoterapia). Se estas associações forem validadas em estudos prospetivos e randomizados, podem ser importantes para a decisão clínica, com potencial para melhorar a terapêutica futura da doença. O objetivo deste trabalho foi efetuar uma revisão sistemática dos estudos sobre subtipos moleculares no carcinoma da bexiga e como a caracterização molecular tem impacto na terapêutica, com especial foco na terapêutica neoadjuvante.

Caracterização Epidemiológica

O cancro da bexiga representa a 9ª doença maligna mais comum a nível global e a 2ª neoplasia génito-urinária mais frequente (1). Os homens são mais afetados que as mulheres (3,2:0,9), constituindo o 4º cancro mais comum no sexo masculino e o 11º no feminino (2). É atualmente a 13ª causa de morte mais comum por cancro no mundo (1). Em 2012 cerca de 430 mil casos foram diagnosticados em todo o mundo, tendo sido registadas 165 mil mortes (3). Os índices de mortalidade não se alteraram nos últimos 10 anos. De acordo com a *World Health Organization* (WHO), a prevalência e a mortalidade da doença irão duplicar num futuro próximo devido ao aumento da esperança média de vida, pois a maioria dos diagnósticos de cancro da bexiga são feitos em indivíduos com mais de 65 anos. A incidência da doença tende a aumentar com a idade (1,4).

O carcinoma urotelial (ou de células de transição) representa 80% a 90% dos casos de cancro da bexiga. A doença tem origem no epitélio que cobre a superfície interna da bexiga (urotélío). As outras variantes histomorfológicas representam 10-25% dos casos, e incluem o carcinoma de células escamosas, carcinoma de pequenas células

e o adenocarcinoma. Estas variantes estão associadas a doença local mais agressiva, doença metastática e má resposta à terapêutica (6).

Aproximadamente 75% dos doentes são diagnosticados com cancro da bexiga não invasivo (CBNI) e 25% são diagnosticados com cancro da bexiga invasivo (CBI) ou doença metastática (8,9). O CBNI pode estar confinado à mucosa (estadio Ta e carcinoma *in situ*) ou à submucosa (T1). Tem uma taxa de recorrência superficial de 50-70%, e uma taxa de progressão para CBI de 10-30% (2,9). O prognóstico é excelente, com uma taxa de sobrevivência global aos 5 anos de cerca de 90% (10,11). O CBI compreende os tumores de T2 (invadem a *muscularis* própria) a T4 (invadem órgãos adjacentes à bexiga - próstata, vagina, útero, parede abdominal ou pélvica). Os CBI são tumores agressivos e a sua sobrevivência sem tratamento aos 5 anos é inferior a 15%. Em cerca de 50% dos casos, estes doentes acabam por desenvolver doença metastática (12,13).

Subtipos Moleculares

O uso do genoma para investigar a heterogeneidade do cancro está a transformar a compreensão da sua biologia. No âmbito do cancro da bexiga, foram, de uma forma geral, identificados 2 subtipos moleculares: basal e luminal.

Os tumores basais da bexiga têm origem em células basais uroteliais, e expressam os seus marcadores (14). Mostram geralmente diferenciação histológica escamosa, e partilham padrões de expressão de células menos diferenciadas, como células estaminais ou mesenquimais. Expressam citoqueratina 5 (KRT5), 14 (KRT14), 6B (KRT6B) e CD44. Alguns dos tumores basais têm expressão genética baixa dos membros da família da Claudina, mas com supra-regulação dos marcadores característicos de transição epitélio-mesenquimal (TEM) (15, 16, 17).

Os tumores luminais da bexiga têm origem em células luminais/intermédias uroteliais. Têm uma morfologia papilar e um crescimento mais superficial. Sobre-expressam marcadores de células terminalmente diferenciadas do urotélio normal, como Uroplaquinas e Citoqueratina 20 (KRT20), E-Caderina, FGFR3 e genes precoces do ciclo celular (como, por exemplo, o CCND1). Os fatores de transcrição *peroxisome*

proliferator-activated receptor- γ (PPARG), recetor de estrogénio (RE) e proteína tumoral p63 e os seus alvos, também são sobre-expressos (15,17). Os tumores luminais expressam também mutações em FGRF3, ERBB2 e 3 e PI3KCA (2,15,18) e expressam genes semelhantes aos das células luminais diferenciadas do cancro da mama (como FOXA1 e GATA3) (15, 17, 19). As características papilares e as variações típicas na sua sequenciação (como as mutações FGFR3) são semelhantes às observadas no CBNI, levantando a suspeita que o CBNI está na origem dos tumores luminais (2, 20). Estudos recentes nas linhagens celulares tumorais realizados no ratinho apoiam esta hipótese (21).

De uma forma mais detalhada, vários subtipos moleculares do cancro da bexiga, com diferentes taxonomias, foram propostos por diferentes entidades nos últimos anos. Com exceção da classificação do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), todas as outras se baseiam nos perfis transcricionais dos tumores analisados (15,20,23,30).

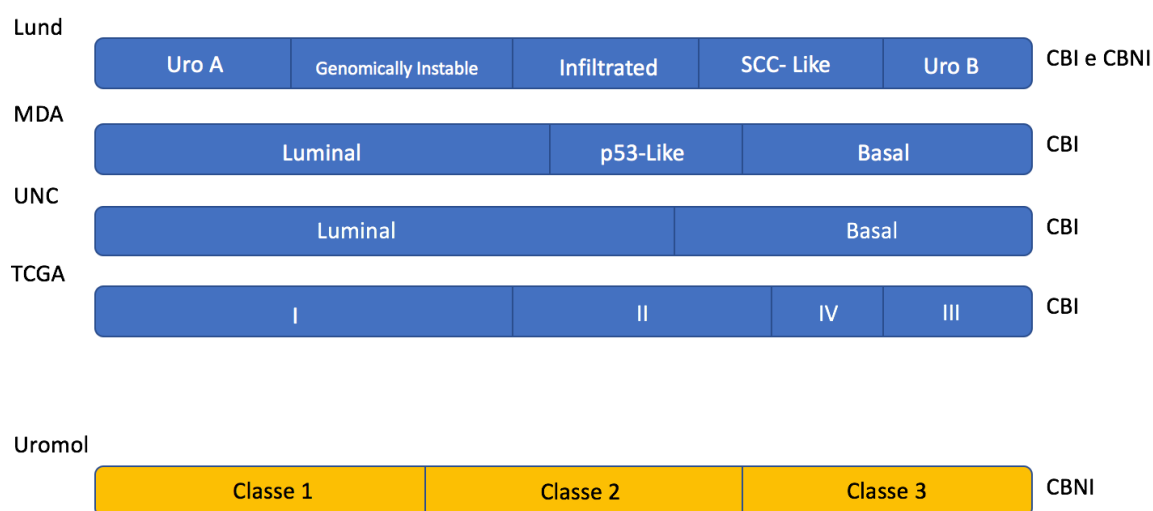


Figura 1: Subtipos Moleculares do Cancro da Bexiga

Adaptado de Sanli O., Dobruch J., Knowles M.A., et al. (2017) Bladder cancer. Nat Rev Dis Primers. 3:17022.

1) LUND (CBI e CBNI)

A classificação da Universidade de Lund (Classificação de Lund), foi a primeira a sugerir uma classificação de subtipos moleculares do cancro da bexiga. Incluiu na sua classificação tumores de todos os graus e estadios, incluindo CBI e CBNI, e dividiu o carcinoma urotelial nos seguintes subtipos: *Urobasal A*, *Genomically instable (GI)*, *(immune cell) Infiltrated*, *Squamous cell carcinoma-like (SCCL)* e *Urobasal B* (23). Os diferentes tipos de tumores mostravam diferentes assinaturas de citoqueratinas e genes relacionados com a queratinização, que ainda não tinham sido descritos, assim como diferentes mutações genéticas e assinaturas da expressão de FGFR3.

Os tumores *Urobasal A* e *Urobasal B* caracterizavam-se por expressão de marcadores de diferenciação e mostravam alta expressão do gene FGFR3, alta frequência de *activating mutations* de FGFR3 e altos níveis de p63 (24). Enquanto os tumores *Urobasal A* tinham bom prognóstico, os tumores *Urobasal B* eram mais agressivos e invasivos e tinham um fenótipo mais *basal-like* com presença de mutações em p53, PIK3CA, CDKN2A e ERBB. Um dado importante, é que os tumores do subtipo *Urobasal A* eram na maioria das vezes CBNI. Foi ainda sugerido que os tumores *Urobasal B* possam representar uma progressão do subtipo *Urobasal A* (24). Os tumores *GI* e *SCCL* eram caracterizados por uma expressão anormal de marcadores associados à diferenciação. Os tumores *GI* não possuíam *activating mutations* de FGFR3, mas tinham a presença de mutações p53 e ERCC2, deleção de RB1 e amplificação de PPARG, GATA3 e ERBB2. O subtipo *GI* revelava ainda alta expressão de genes mais tardios do ciclo celular, como os que codificam a família das ciclinas B e E, e mantinham marcadores da diferenciação urotelial, como as uroplaquinas. Os tumores *SCCL* mostraram alta expressão de EGFR, citoqueratinas *basal-type* (como KRT5/6) e citoqueratina 14 (KRT14), associadas à diferenciação escamosa. Mostravam ainda infra-regulação de PPARG, RXRA, FOXA1 e GATA3. Os tumores *Infiltrated* revelaram marcadores de infiltração de células imunes e do estroma (23,24). Mostravam ainda alta expressão de biomarcadores da matriz extracelular, células imunes, fibroblastos, e baixos níveis de genes tardios do ciclo celular.

Os autores afirmaram que as classificações eram independentes da sua histologia. No entanto, a análise histológica de cada subgrupo mostrou que os tumores *Urobasal A* continham um grande número de lesões de baixo-grau e os tumores *SCCL*

tinham mais propensão a exibirem uma diferenciação em células escamosas. Já os tumores Ta baixo-grau foram maioritariamente classificados como Urobasal A. O estadio T1 e tumores de alto-grau continham menos tumores *Urobasal A*, e mais dos subtipos *GI* e *Infiltrated* (subtipos que mostram sobreposição com o subtipo Luminal). No entanto, alguns foram classificados como *urobasal B* e *SCCL* (ambos grupos *basal-like*). Os tumores T1 foram então descritos como um grupo molecularmente heterogéneo, o que se reflete no seu comportamento clínico variável, mostrando que os subgrupos moleculares transcenderam o estadio patológico, e mostrando que subagrupar os tumores T1 em função dos marcadores moleculares pode ser importante para identificar doentes com doença agressiva (23).

Num outro estudo, os investigadores mostraram que a expressão de mRNA de marcadores de progressão tinham uma forte associação com os subtipos moleculares: O risco de progressão era baixo para tumores *Urobasal A* e *B*, e alto para *GI* e *SCCL*. Os fatores de risco para progressão, como multifocalidade, carcinoma *in situ* urinário concomitante, grau de invasão e invasão linfovascular foram observadas apenas nos últimos 2 (*GI* e *SCCL*) (25).

2) MDA (CBI)

Na classificação estabelecida pelo grupo de *MD Anderson Cancer Center* (Classificação MDA), Choi e colaboradores geraram 2 coortes a partir de duas bases de dados, contanto com transcriptomas totais de 73 e 57 CBI. Os resultados revelaram assinaturas genéticas *basal-like* e *luminal-like*, remetendo para a classificação molecular do cancro da mama (15, 26).

Os carcinomas basais pareciam mostrar características sobreponíveis com o subtipo *SCCL* de Lund. Tinham características escamosas e sarcomatóides, e doentes com estes tumores tinham frequentemente doença metastática à apresentação. Os tumores deste subtipo expressavam altos níveis de EGFR e alguns dos seus ligandos, e citoqueratinas (15).

O grupo luminal era composto por biomarcadores epiteliais, como a E-caderina, e mostrou altos níveis de mutações FGFR3. Os autores descreveram um subgrupo de tumores luminais, a que chamaram de tipo *p53-like*. Este grupo pode ser distinguido do subtipo luminal pela presença de uma assinatura genética de expressão de *p53 wild-type*

e expressão de marcadores estromais. Foram apontadas semelhanças com o subtipo *Infiltrated* de Lund, devido à expressão de marcadores estromais, mas também por infiltração de fibroblastos e expressão de proteínas de matriz extracelular. Foi ainda apontado como sobreposição do tipo luminal e basal (15, 25).

3) UNC (CBI)

Damrauer e colaboradores, da Universidade da Carolina do Norte estabeleceram a classificação UNC, e identificaram os subtipos luminal e basal de CBI. O grupo basal mostrava uma forte expressão de citoqueratina 5, citoqueratina 6, CD44 e alterações genéticas da via RB1. Concluíram também que os tumores do subtipo basal tinham o pior prognóstico. Foi determinado um subgrupo de tumores basais: O subtipo *Claudin-low*, que expressava nível baixo de claudina e supra-regulação de marcadores TEM. O grupo luminal contava com mutações em PPARG, GATA3, KRT20, UPK2 e FGFR3 (30).

4) TCGA (CBI)

Em 2014, o estudo inicial do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), de S. Lerner e K. Hoadley, sequenciou todo o genoma de 131 tumores invasivos da bexiga. Analisou mutações somáticas, variação no número de cópias (CNVs), expressão de mRNA e miRNA, metilação do DNA e expressão de proteínas (RPPA). Neste que foi o estudo original, foram encontrados 32 genes significativamente mutados (20).

O *update* deste estudo, que se realizou em 2015, e que incluiu 412 tumores uroteliais (incluindo os anteriores), identificou 54 genes significativamente mutados. Este *update* mostrou que o CBI tem um perfil genético heterogéneo, e coloca-o como o terceiro cancro com mais mutações, depois do melanoma e carcinoma do pulmão (20, 35). Estas mutações estavam envolvidas em múltiplas vias, como da regulação do ciclo celular (93% dos tumores, como TP53, RB1), mas também em CDKN1A, CDKN2A, CCND1, CNE1 e MDM2. Havia também alterações em genes relacionados com o *remodeling* da cromatina (76% dos tumores), resposta à danificação do DNA, fatores de transcrição e recetores da tirosina cinase (RTK)/RAS/PI3K (72% dos tumores). O gene TP53, um oncosupressor, era o gene mais frequentemente mutado, com inativação em 76% das amostras. O RB1 estava também frequentemente mutado (14% dos casos) (24).

Este estudo dividiu o CBI em 4 clusters. O Cluster I abrangia tumores com morfologia luminal e características papilares. Mostrava mutações, fusões, e expressão aumentada de mRNA e proteica de FGFR3 (23, 36). O cluster II, incluía os tumores p53-like (15). Os clusters I e II correspondiam ao subtipo luminal e expressavam marcadores uroteliais associados a diferenciação (FOXA1, UPK3A, ERBB2 e GATA3), altos níveis de E-caderina, e altos níveis de membros da família miR-200 (29, 37). Estes 2 clusters tinham também sobre-expressão de HER2 (ERBB2) e de recetor do estrogénio beta (ERb), partilhando características com os tumores Luminais A da mama. O Cluster III tinha características basais, expressando altos níveis de KRT5, KRT14, KRT6A e EGFR e CD44. Este cluster mostrava características semelhantes ao cancro da mama *basal-like*, e carcinoma de células escamosas da cabeça, pescoço e pulmão (20). O Cluster IV, também basal, tinha algumas características do cluster III, mas com características do tecido muscular e estroma das proximidades da amostra. Mostrava semelhanças com o subtipo *claudin-low* da classificação UNC (30), como a expressão baixa de E-caderina e membros da família miR-200. Alterações nas vias reparadoras de DNA encontravam-se presentes nos 4 clusters (38).

Esta caracterização genética deu-nos informação sobre os *drivers* genéticos que podem servir como alvos terapêuticos, mas também dos subtipos/clusters do CBI, que podem estar associados a prognóstico e terapêuticas específicas, o que pode representar um passo importante no caminho para a terapêutica individualizada (20).

5) Uromol (CBNI)

O estudo UROMOL classificou os tumores não invasivos da bexiga (CBNI) em 3 classes. Os tumores da classe 1 mostravam o melhor prognóstico. As lesões eram semelhantes ao grupo *Urobasal A* da classificação Lund, e caracterizavam-se por alta expressão de genes precoces do ciclo celular e uroplaquinas (marcadores de diferenciação). Os tumores de classe 2 expressavam genes tardios do ciclo celular, e eram a classe que continha mais tumores T1 e alto-grau (33). Esta classe incluía a maioria dos doentes que progrediram para CBI. Este resultado sugere que os tumores de classe 2 poderão representar tumores de origem para o CBI luminal (34). Os tumores de classe 3 mostravam alta expressão de KRT5 e 15 (característica das células indiferenciadas, logo basais), e altos níveis de RNAs não codificantes (lncRNAs). Partilhavam características com o subtipo *urobasal A* (incluindo as mutações FGFR3),

mas também algumas características da assinatura basal do CBI (fenótipo de KRT5+, KRT14+, CD44+, KRT20–, PPARG–) (30). Nestes tumores, a supra-regulação de muitos RNAs não codificantes, alguns implicados na senescência induzida por oncogenes, apoia a hipótese de que estes tumores podem representar um estadió tumoral luminal dormente (32). A sobreposição dos subtipos deste estudo com os restantes ainda não é clara (32).

6) Sobreposição de Classificações

Apesar de várias instituições e investigadores terem estabelecido diferentes classificações de subtipos moleculares, estas parecem ser sobreponíveis, especialmente quando se considera o subtipo basal e luminal (40). Há dados que apontam para que os subtipos moleculares reflitam vários graus de diferenciação tumoral.

O grupo MDA comparou a sua classificação à de LUND, TCGA e UNC, e de uma forma geral, havia concordância entre as classificações. Os tumores MDA Basais correspondiam bem ao *SCCL* de LUND, ao cluster III e IV TCGA, e ao *basal* da UNC. Os tumores MDA luminais correspondiam bem ao *GI* de LUND, cluster I TCGA e ao subtipo luminal UNC. Os tumores p53-like MDA correspondiam bem ao *Infiltrated* de LUND, ao cluster II TCGA, e ao luminal UNC (41, 42, 15, 27). Os tumores *Urobasal A* e *GU* de LUND correspondiam fortemente aos tumores luminais UNC.

Aine e colaboradores compararam a classificação TCGA com as restantes classificações, e concluíram que existia uma extensa sobreposição, que poderia ser organizada numa ordem hierárquica, com a UNC com a menor resolução, seguida pela MDA, e as classificações TCGA e de LUND com a maior resolução (44).

Assim, 4 grupos independentes, que usaram diferentes coortes de CBI, descobriram subtipos muito semelhantes, o que deixa poucas dúvidas para que representem subtipos intrínsecos de CBI. Também a metodologia para identificar estes subtipos foi diferente, e o facto de terem chegando a conclusões semelhantes, sugere que os subtipos são altamente reproduzíveis e biologicamente relevantes, independentemente da forma como são nomeados (45).

7) Consenso

O rápido progresso de caracterização genómica resultou numa variedade de taxonomias, o que chamou para o estabelecimento de um consenso, realizado em Março de 2015, com alguns dos investigadores que tinham proposto as classificações dos subtipos de cancro da bexiga (14).

Um dos desafios foi reunir todos os dados existentes, de forma a alcançar um conhecimento mais profundo sobre os mecanismos moleculares subjacentes à existência de vários subtipos moleculares. Um outro objetivo foi estabelecer uma forma prática de estratificar doentes com base no prognóstico e resposta terapêutica. O subtipo reconhecido por todos os grupos foi chamado de BASQ (*basal squamous-like*). Os tumores deste subtipo expressam marcadores de células basais (KRT5/6 e KRT14) e baixa expressão de RNA e proteica de FOXA1 e GATA3 (153). Importa dizer que nem todos os tumores deste grupo vão apresentar características histológicas escamosas, e que nem todos os tumores com características escamosas pertencem a este grupo (14). Perante os resultados preliminares sobre relação dos subtipos moleculares e resposta à terapêutica, doentes com este tipo de tumor podem vir a ser aconselhados a receber QT neoadjuvante com cisplatina, enquanto outros doentes podem necessitar de novas terapêuticas alvo. Foi também estabelecido um grupo de consenso relacionado com os tumores *Urobasal A* da classificação Lund (14,47), mas o grupo reunido concluiu que não existiam dados suficientes para alcançar um consenso sobre a sua definição molecular. Apesar da reunião de consenso ter sido o primeiro passo para a existência de uma taxonomia standardizada, mais harmonização será necessária no futuro para um melhor entendimento e aplicação clínica (14).

A utilização de técnicas específicas de sequenciação de DNA são processos dispendiosos e que apenas podem ser realizados em centros com técnicas especializadas. O uso de anticorpos específicos para definir subtipos moleculares facilitaria a implementação de uma classificação molecular na prática histopatológica de rotina. Dadhania e colaboradores investigaram as amostras do coorte da classificação MDA, e identificaram que a expressão imunohistoquímica de um conjunto de 2 marcadores: GATA3 (luminal) e (KRT5/6) (basal) eram suficientes para discriminar tumores basais e luminais com 90% de precisão (17).

Quimioterapia no cancro da bexiga

1) Terapêutica padrão do cancro da bexiga

A terapêutica padrão para os CBNI é a ressecção transuretral, seguida por administração intravesical de Bacilo de *Calmette-Guérin* (BCG) ou Quimioterapia, dependendo de fatores clínicos e patológicos. Estes doentes requerem uma monitorização a longo-termo, com vigilância periódica com cistoscopia, avaliação citológica e imagiológica, pela elevada probabilidade de recorrência (2,35,48).

A terapêutica padrão para o CBI localizado é a cistectomia radical com ressecção dos gânglios linfáticos pélvicos (49, 50), uma vez que cerca de 25% dos doentes têm envolvimento dos gânglios linfáticos no momento da cistectomia, o que pode não ser visível imagiologicamente. A sobrevivência específica aos 5 anos depois da cistectomia é relativamente baixa, com valores de 72% nos doentes com doença localizada e 48-25% em doentes com extensão extravesical ou metástases ganglionares (51). A sobrevivência global 5 anos depois deste procedimento não excede os 50-60%, sugerindo a presença de micrometástases no momento da cirurgia.

Estes dados apoiam a utilização de terapêutica peri-operatória, de forma a alcançar um melhor controlo da doença e maior sobrevivência (51, 52, 53).

2) Perspetiva histórica da Quimioterapia no cancro da bexiga

Depois da descoberta da cisplatina em 1965 por Rosenberg, vários estudos investigaram a sua utilização no cancro da bexiga metastático, demonstrando taxas de resposta global de 26-65% (54,55,56). Neste período, o metotrexato, a vimblastina e a doxorrubicina mostraram também eficácia na terapêutica do cancro da bexiga (57, 58), e numa tentativa de melhorar os resultados da QT com agente único, vários estudos com esquemas com múltiplos foram testados. O mais relevante foi desenvolvido por Sternberg e colaboradores, em 1985, com 24 doentes com carcinoma do trato urinário, com doença metastática ou não ressecável, que foram submetidos a QT com um esquema de metotrexato, vimblastina, doxorrubicina e cisplatina (MVAC). Foi observada uma regressão tumoral em 71% dos doentes, e uma resposta patológica completa em 50% dos doentes (59, 60). Neste período foram ainda desenvolvidos ensaios clínicos cujos resultados mostraram aumento da sobrevivência quando era

administrado este esquema, em comparação com a cisplatina ou combinação de cisplatina, doxorrubicina e ciclofosfamida (61,62).

As taxas de resposta e sobrevivência com MVAC eram promissoras, mas a toxicidade era considerável, com neutropenia febril, mucosite e um número significativo de mortes relacionadas com toxicidade. Esta toxicidade impediu a adoção deste esquema a larga escala. Outros agentes de QT foram avaliados, com sucesso limitado, até resultados promissores com a gemcitabina terem sido publicados em 1994 (63). A combinação da gemcitabina e cisplatina (GC) mostrou eficácia com um melhor perfil de segurança em estudos de fase II (64, 65), o que levou no ano de 2000 ao desenvolvimento de um estudo de fase III com 405 doentes com cancro da bexiga metastático ou avançado, comparando este esquema com a utilização de MVAC standard (66). Na análise da sobrevivência a 5 anos, a sobrevivência livre de doença e a sobrevivência global eram semelhantes com as 2 combinações (67). O esquema GC tinha a melhor tolerância, com um menor número de sépsis neutropénica, mucosite e menor necessidade de ajuste de dose, mas sem uma diminuição significativa do número de mortes associadas a toxicidade (66).

Com o objetivo de melhorar a tolerância da MVAC convencional, foi efectuado um estudo de fase III, em que 263 doentes com doença avançada ou metastática foram randomizados para receber um esquema de MVAC convencional *vs* um *esquema dose-dense* MVAC (ddMVAC) (69). Na modalidade ddMVAC foi observado um maior número de respostas completas e um benefício na sobrevivência. O esquema *dose-dense* era melhor tolerado e teve menos casos de neutropénia febril, trombocitopénia e mucosite (68).

3) Quimioterapia Neoadjuvante

O objetivo da QT neoadjuvante é a erradicação precoce de micrometástases, assim como o *downstaging* do tumor primário em doentes com estadio clínico de T2-T4a N0M0 no CBI, em candidatos para cirurgia definitiva ou radiação. A identificação e confirmação da eficácia da QT neoadjuvante para doentes com CBI demorou cerca de 20 anos de investigação a comprovar, com esquemas de terapêutica a serem extrapolados a partir do contexto metastático (154).

No início dos anos 2000, vários estudos demonstraram uma vantagem modesta, mas significativa na sobrevivência, com a utilização de QT neoadjuvante. Dois grandes ensaios randomizados (72, 73) e duas meta-análises (70, 71) demonstraram benefícios na sobrevivência para a QT neoadjuvante em comparação com cirurgia isolada no CBI. Um destes ensaios foi realizado em 2003, pelo *Southwest Oncology Group* (SWOG) (72). O estudo randomizou 317 doentes com CBI operável T2-T4, para receberem 3 ciclos de MVAC seguida por cistectomia radical, ou cistectomia isolada sem terapêutica prévia. A sobrevivência global era maior em doentes que tinham realizado quimioterapia (mediana de 77 vs 46 meses) ($P=0,06$). Os resultados mostraram também que os doentes que receberam QT tinham uma taxa de resposta patológica completa melhor *versus* os que realizaram apenas cistectomia (38% vs 15%, $P>0,001$) (72, 155).

No estudo da *International Collaboration of Trialists* (73) foram avaliados *outcomes* oncológicos a longo-termo de doentes com doença T2, T3 ou T4a, que foram randomizados para receber 3 ciclos de QT neoadjuvante com cisplatina, metrotexato e vinblastina (CMV) ou para não fazerem QT antes da terapêutica principal (cirurgia ou radiação). A QT neoadjuvante revelou uma redução estatisticamente significativa de 16% no risco de morte por qualquer causa ($p=0,037$), o que correspondia a um aumento de valores de 30% para 36% de sobrevivência global aos 10 anos, nos doentes que tinham recebido QT neoadjuvante. Para além disso, quase todos os outros *outcomes* oncológicos eram a favor do uso da QT neoadjuvante, como uma redução de 23% do risco de metástases ($P=0,001$) e redução de 18% do risco de recorrência da doença ($P=0,008$). No subgrupo dos 428 doentes que realizaram cistectomia, a resposta patológica completa era maior no braço que tinha realizado QT (32% vs 12%) (75).

Estes estudos mostraram também diminuição de 16-33% do risco de mortalidade para aqueles que receberam QT neoadjuvante *versus* cistectomia isolada, com uma mediana da sobrevivência de 44 meses e 37,5 meses (respetivamente). A sobrevivência, medida aos 3 anos e 10 anos de vigilância aumentou em 6% para os grupos submetidos a QT neoadjuvante (72, 73).

Em 2005 foi realizada uma meta-análise que esclareceu de forma definitiva a utilidade da QT neoadjuvante, e que mostrou benefício na sobrevivência. *The Advanced Bladder Cancer Meta-Analysis Collaboration* incluiu dados de 3005 doentes de 11 ensaios randomizados controlados. Os resultados mostraram um benefício na

sobrevivência total aos 5 anos de 5% para a QT neoadjuvante com cisplatina ($p=0,003$). A sobrevivência melhorou de 45% para 50% com 14% de redução do risco de morte ($p=0,02$) (70). Para além disso, houve um benefício na sobrevivência livre de doença com um aumento absoluto de 9% aos 5 anos ($P<0,001$) (71).

Os esquemas múltiplos de QT que mostraram eficácia no contexto metastático foram avaliadas no neoadjuvante. Uma análise retrospectiva de QT neoadjuvante em 19 instituições europeias e americanas comparou os *outcomes* dos esquemas utilizados em 1000 doentes com CBI. 64,4% dos doentes receberam GC, 19,6% receberam MVAC e 15,4% receberam esquemas alternativos. Os resultados mostraram que a taxa de resposta patológica completa (ypT0N0) era semelhante para a GC (23.9%) e a MVAC (24.5%), sem alterações na sobrevivência (76). Apesar de nunca terem sido feitos estudos prospetivos com o esquema GC, é considerado a terapêutica standard como QT neoadjuvante no CBI, devido à sua eficácia e melhor tolerância (77).

Devido à boa resposta clínica no contexto metastático, o esquema ddMVAC estudou-se também no contexto neoadjuvante. Dois estudos prospetivos de fase II, de Plimack e colaboradores (78) e de Choueiri e colaboradores (79), utilizaram 3 ciclos (78) e 4 ciclos (79), respetivamente, de ddMVAC com suporte de fator de crescimento. Os resultados mostraram que este esquema era seguro e eficaz, com mais de 90% dos doentes a completar o número de ciclos propostos. Os resultados mostraram uma taxa de resposta patológica ($<pT2$) de 53% (78) e 49% (79). Mostravam ainda uma taxa de resposta patológica completa de 38% (78) e 28% (79). Ambos os ensaios incluíram doentes com doença N1 (7 e 43% dos doentes, respetivamente), o que poderá explicar esta diferença de resultados. 82% dos doentes N1 do estudo de Choueiri tinham doença pN0 no momento da cirurgia, contribuindo para a importância desta modalidade nestes doentes, que ganhou importância como uma forma de diminuir tempo até à cistectomia e melhorar a resposta patológica sem aumentar a toxicidade (80).

Um estudo com GC *dose-dense* (ddGC) foi também realizado. No entanto, o ensaio clínico foi encerrado precocemente devido a cardiotoxicidade de 7 dos 31 doentes incluídos, apesar de o esquema conferir uma taxa de resposta patológica $< pT2$ de 45% (81). Um estudo posterior de fase II, que excluiu doentes com eventos cardiovasculares reportou melhor tolerância. Terá de ser feita mais investigação antes de esta modalidade ser adotada para a rotina terapêutica (82).

Mais recentemente, um estudo retrospectivo de um único centro comparou a administração de GC, MVAC e ddMVAC em doentes com CBI. Os resultados mostraram resposta patológica completa (ypT0N0) de 32%, 20% e 29% (respetivamente). A taxa de toxicidade no ddMVAC (32%) era a mais baixa, e a da GC (44%) era inferior à do esquema clássico de MVAC (55%). Além disso, como 3 ciclos de ddMVAC têm menos 3 semanas de duração que no esquema de GC, os autores concluíram que ddMVAC deveria ser opção preferencial na QT neoadjuvante (83). Num outro estudo retrospectivo, de 2017, com vários centros, ddMVAC foi associado a resposta completa em um terço dos doentes e reposta parcial p(T1N0) em aproximadamente 50% dos casos (84).

As *guidelines* das principais organizações urológicas, como a *European Association of Urology* (EAU) e a *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) recomendam a utilização da QT neoadjuvante em doentes com doença T2-T4aM0No. A QT de primeira linha deve conter cisplatina (14,86,86). Esta é dada frequentemente associada à gemcitabina (GC), devido a menor toxicidade, tendo o esquema MVAC vindo a ser substituído na última década. Nos centros que preferem utilizar MVAC, o esquema clássico tem vindo a ser substituído por ddMVAC (76, 87). Estudos mostram que uma reposta patológica completa (ypT0N0) depois da QT neoadjuvante está associada a uma sobrevivência global aos 5 anos de 80-90% (valor que desce para 45% em doentes com carcinoma residual) (88, 89). Os resultados que apoiam a utilidade da QT adjuvante são menos robustos (48,86). A QT neoadjuvante mostra uma melhor tolerância que a terapêutica adjuvante, devido à morbilidade importante pós-operatória, que pode impedir um número importante de doentes de receber esta terapêutica (90, 91, 92). Num estudo de uma única instituição, com 1142 doentes submetidos a cistectomia radical, 64% tinham uma ou mais complicações, e 30% dos doentes tiveram complicações que os impediram de ser submetidos a QT adjuvante (93).

A comunidade médica tem adotado a terapêutica neoadjuvante com algumas reservas (94,95). O seu uso era de 1,2% em 1998-2003 (96) e 17% em 2003-2008 (97). As razões devem-se ao facto de o benefício ser pequeno (98, 99,100), efeitos tóxicos, e a impossibilidade de selecionar doentes que vão beneficiar da terapêutica, com risco de atraso da cirurgia (101, 102)). Dados recentes indicam um aumento dos números de utilização desta terapêutica no cancro da bexiga, nos últimos anos (103).

Os números atuais apontam para que apenas uma fração de doentes que recebem QT neoadjuvante tenham benefício. Estima-se que se todos os doentes com doença cT2–4aN0M0 elegíveis recebessem este tratamento, mais de 70% seriam expostos a potencial toxicidade sem benefício claro (104, 105). Esta toxicidade traduz-se em alterações como perda de audição, alterações renais e neuropatia. Uma meta-análise mostrou que o número necessário para tratar, para salvar uma vida, aos 5 anos de vigilância depois de QT neoadjuvante, se todos os doentes forem tratados, é de 17 (106). Assim, descobrir biomarcadores e fatores preditivos de resposta à terapêutica neoadjuvante seria importante para selecionar os doentes com vantagem em recebê-la, e otimizá-la.

4) Prever resposta à Quimioterapia Neoadjuvante

Atualmente, apenas alguns parâmetros preditores clínicos e patológicos identificam doentes que poderão beneficiar da QT neoadjuvante, baseando-se em fatores de risco. Culp e colaboradores desenvolveram um modelo de estratificação de risco, de acordo com a presença de doença cT3b-T4a, hidroureteronefrose, invasão linfovascular, subtipos neuroendócrino e micropapilar (105) ou índice de alta proliferação do tumor inicial sem QT prévia (107), mas a capacidade preditiva destes fatores é limitada.

Ainda não existem métodos validados para prever a resposta à QT, o que resulta num possível sobretratamento em doentes que não respondem, com toxicidade desnecessária que pode deteriorar o estado físico de doentes já fragilizados, e tornar impossível uma eventual terapêutica alternativa adicional. Mais uma vez, seria importante identificar os doentes que responderão à terapêutica antes dela se iniciar. Por isso nos últimos 10-12 anos múltiplos estudos descreveram características genómicas e biomarcadores numa tentativa de prever a resposta à QT neoadjuvante. Uma extensa lista de moléculas, implicadas na proliferação celular, apoptose, regulação do ciclo celular, adesão celular, hipóxia e angiogénese foram investigadas neste âmbito (108).

Um estudo de 2007 mostrou que a EMMPRIN (CD147), uma proteína de membrana e moduladora das metaloproteínases de matriz, e a Survivina, que pertence à família das proteínas inibidoras da apoptose, eram importantes para prever a resposta à QT. A expressão negativa dos dois marcadores era preditiva de resposta à QT paliativa com cisplatina (109). Num estudo posterior, retrospectivo, uma expressão negativa de

EMMPRIN em doentes que receberam QT neoadjuvante resultou numa sobrevivência global maior em comparação com expressão positiva (71% vs 38% $P<0,001$). Doentes com EMMPRIN negativa tinham, depois da QT neoadjuvante, uma redução de 25% no risco absoluto sobrevivência global (OS). Doentes com este marcador positivo não tinham benefício na sobrevivência ao ser submetidos a esta terapêutica (110). O transportador CTR1 foi também estudado, e parece ter importância no *uptake* de cisplatina para as células tumorais. Kilari e colaboradores demonstraram que os níveis de expressão deste transportador se correlacionavam de forma significativa com o *downstaging* do tumor ou resposta completa (111,112,113). Investigação *in vitro* mostrou que a expressão de BCL-2 (regulador da apoptose) está associada à resistência à cisplatina. Kiss e colaboradores reportaram que em 55 doentes submetidos a QT neoadjuvante, apenas 13% dos doentes com tumores que expressavam BCL-2 tinham respondido à terapêutica, podendo ser útil para prever a resposta (114). Nomura e colaboradores analisaram a expressão proteica e mRNA de DYRK2 num coorte de 44 doentes com CBI, onde foi obtida resposta completa em 20 de 21 doentes que expressavam DYRK2, comparativamente com 11 em 23 que não o expressavam. A expressão de DYRK2 manteve-se estatisticamente significativa para a sobrevivência livre de doença ($P=0,029$). Assim, esta expressão pode ter um papel para prever a resposta a QT neoadjuvante (115). Alguns autores sugeriram também que a alteração da expressão de p53 pode estar associada a resistência a QT neoadjuvante (116, 15, 30).

Mais recentemente, vários estudos mostraram que algumas mutações nos genes das vias reparadoras de DNA (*FANCC*, *ATM* e *RB1*) se relacionam com uma resposta patológica completa à QT neoadjuvante. Num estudo prospetivo, Plimack e colaboradores recolheram amostras tumorais antes da QT neoadjuvante com MVAC, que foram sequenciadas para exões codificantes de 287 genes relacionados com cancro, tendo sido feita análise para substituição de bases, alterações do número de cópias e rearranjos. O coorte de validação foi realizado com QT com GC (78, 117, 81). Doentes com resposta patológica completa tinham mais alterações que aqueles com tumor residual ($P=0,024$ e $0,018$). No *discovery cohort*, as alterações em um ou mais genes ATM, RB1 e FANCC previam resposta patológica ($p<0,001$) e melhor sobrevivência global ($p=0,007$) (155).

Van Allen e colaboradores sequenciaram o genoma, numa coorte de 50 doentes com CBI que tinham recebido QT neoadjuvante com cisplatina. 36% dos doentes que

responderam (pT0–pTis aquando da cistectomia) tinham mutações somáticas em ERCC2, e nenhum dos não respondedores as tinham. Em experiências *in vitro*, os investigadores mostraram que ERCC2 *wild-type* atenuava parcialmente a sensibilidade à cisplatina, e a perda de função de ERCC2 resultava num aumento desta sensibilidade à terapêutica. Assim os investigadores concluíram que as mutações ERCC2 estavam relacionadas com resposta completa a cisplatina, e eram preditivas de resposta a QT neoadjuvante (118). Os resultados foram validados num pequeno coorte em separado. De novo, as mutações eram encontradas em maiores proporções em respondedores à terapêutica com cisplatina (40%), mas em apenas 7% dos não respondedores. Além disso, tanto no *discovery cohort* como no de validação, os doentes com mutações ERCC2 que recebiam quimioterapia neoadjuvante com cisplatina tinham maior sobrevivência global (OS) que os tumores *wild-type* ERCC2 (119). Os autores mostraram também que as mutações em ERCC2 são encontradas mais frequentemente em carcinomas uroteliais que em outras neoplasias (13% vs <4%) (38). Foi também descrito que tumores com mutações ERCC2 têm maior carga mutacional que outros CBI (20) e estão associados à presença de uma assinatura genómica prevalente nos CBI dos fumadores (120). Um outro estudo determinou que mutações recorrentes em ERBB2 (envolvido nas vias de proliferação celular) estava também associado a resposta patológica completa a QT neoadjuvante. Os autores usaram um painel de sequenciação de 178 genes, e traçaram o perfil de 38 doentes que tinham respondido completamente à terapêutica (ypT0N0) e de 33 não respondedores (>ypT2). Identificaram mutações de ERBB2 em 9 respondedores completos (23%), mas nenhum dos não respondedores tinha alterações em ERBB2 ($P = 0.003$). Neste estudo também encontraram mutações em ERCC2. No entanto, não foi possível associar a mutação ERBB2 de forma significativa a resposta completa, o que pede mais exploração para validação dos destes resultados (156).

Um grande ensaio multi-institucional, randomizado, de fase II realizado pelo Southwest Oncology Group (SWOG), está atualmente em desenvolvimento, para testar a eficácia do princípio de *coexpression-extrapolation* (COXEN) na capacidade de previsão da resposta de um determinado tumor à QT neoadjuvante no CBI (121). A partir de um algoritmo, é gerado um score de previsão de resposta à terapêutica, com base nos perfis de expressão molecular partilhados entre tumores e linhas celulares (122, 123). Os doentes deste ensaio serão randomizados para QT neoadjuvante GC ou

MVAC. Este estudo vai validar a utilidade dos princípios COXEN e será o primeiro estudo prospectivo a testar a capacidade dos scores COXEN na previsão da resposta à QT neoadjuvante no carcinoma da bexiga (157).

Relação dos subtipos moleculares com a terapêutica

1) Relação com QT Neoadjuvante

Choi e colaboradores desenvolveram um dos estudos mais importantes no âmbito da relação dos subtipos moleculares com a resposta à QT neoadjuvante. No *discovery cohort*, os investigadores usaram os transcriptomas de 73 amostras de CBI, que agruparam de acordo com os subtipos moleculares, gerando a classificação MDA (15). No *discovery cohort*, dos 7 tumores p53-like tratados com QT neoadjuvante (MVAC), nenhum respondeu à terapêutica. Esta quimioresistência foi confirmada no *validation cohort* e noutros coortes gerados pelos mesmos investigadores, a partir de análise de informação de bases de dados públicas. A resistência à QT estava provavelmente associada a um estado quiescente das células tumorais (15). Por sua vez, os tumores basais estavam associados a quimiosensibilidade. Cerca de 50% dos tumores do subtipo basal, ao receberem QT neoadjuvante, sofriam *downstaging* patológico para menos de pT2 (15). Um dado importante deste estudo, é que muitos dos tumores inicialmente classificados como basal ou luminal parecem mostrar um *shift* na expressão genética, para um fenótipo *p53-like*, depois da QT neoadjuvante (15). Além disso, todos os tumores resistentes à QT adotavam um fenótipo *p53-like* (15,27) o que pode refletir um mecanismo adquirido de quimiorresistência ou seleção de subclones resistentes à QT (28,29).

Em 2016, outro estudo efetuado pela equipa de Choi, veio confirmar os resultados anteriores. Neste estudo foram utilizados os mesmos moldes do anterior. As amostras tumorais de 60 doentes com CBI que iriam fazer 4 ciclos de ddMVAC foram classificadas de acordo com a classificação MDA. Após terapêutica, os tumores basais mostravam uma sobrevivência global aos 5 anos de 91%, os luminais de 73% e os p53-like de 36% ($p = 0.015$). Mais uma vez, os resultados mostraram quimioresistência do subtipo p53-like, que foi também associado a doença agressiva e doença metastática óssea. Os doentes com o subtipo basal eram os que mais beneficiavam com a terapêutica

neoadjuvante. Estes doentes apresentavam o pior prognóstico antes da QT, mas o melhor depois desta. Estes resultados foram confirmados num coorte separado, com 49 doentes submetidos a QT neoadjuvante com MVAC. (124).

Num estudo de 2017, Seiler e colaboradores, classificaram 343 amostras de CBI submetidas a QT neoadjuvante e cirurgia, e 476 submetidas apenas a cirurgia, em função dos seus subtipos moleculares (claudin-low, basal, luminal-infiltrated ou luminal). Os tumores basais eram os tumores com o pior prognóstico quando tratados com cirurgia isolada. Mas era o subtipo que sofria mais *downstaging* tumoral, e que mostrava a maior melhoria na sobrevivência global quando era feita QT neoadjuvante, em comparação com cirurgia isolada, confirmando que estes indivíduos poderiam representar os melhores candidatos à QT neoadjuvante. Os tumores luminais tinham a maior sobrevivência global com e sem QT neoadjuvante, e pareciam não ter benefício com a terapêutica. Os tumores do subtipo claudin-low estavam associados a uma baixa sobrevivência global, sem relação com a terapêutica (125).

Quanto ao prognóstico, os tumores basais são tumores mais agressivos e invasivos (15, 17) e cursam mais frequente doença metastática ou avançada, conferindo menos tempo de sobrevivência (20, 24, 44). São tumores caracterizados por alto nível de infiltração imune, expressão tumoral de PDL-1 e expressão de marcadores de transição epitélio-mesenquimatoso (126), o que poderá ter importância para a avaliação da previsão resposta à imunoterapia, explicitada em seguida.

Os subtipos *SCCL* e *Urobasal B* de LUND e os tumores basais identificados pelos grupos UNC, MDA e TCGA eram agressivos e associados a estados mais avançados e doença metastática na apresentação. Continham características histopatológicas escamosas e pior sobrevivência na ausência de QT neoadjuvante (20, 23,30). Assim, os subtipos basais têm pior prognóstico (*TCGA II*, *TCGA IV*, *urobasal B* ou *SCCL*), em comparação com o luminal (*TCGA I* ou *Urobasal A*) (15, 23).

Outro dado encontrado nestes estudos mostrou que as mulheres com CBI têm pior outcomes que homens (127), e parecem ter uma prevalência aumentada de tumores do tipo basal (20).

2) Relação com Terapêutica dirigida

Muitas das alterações genómicas do cancro da bexiga potencialmente relacionadas com a terapêutica-alvo, estão associadas aos subtipos moleculares já descritos.

Um dado importante prende-se com o facto de existirem semelhanças entre os subtipos moleculares do cancro da bexiga e os do cancro da mama, e o facto deste último ter resultados benéficos na utilização da terapêutica-alvo (157).

Estudos como o TCGA, permitiram elucidar o alto grau de heterogeneidade genómica do cancro da bexiga, tendo-se verificado que a maioria dos doentes com CBI (68%) tinha alterações genómicas que poderiam tornar os tumores sensíveis a terapêuticas-alvo. Especificamente, foram encontradas alterações recorrentes nas vias (RTK)– MAPK (45%) e PI3K–MTOR (42%) (20).

As alterações da via PI3K–MTOR eram em TSC1 e TSC2 (9%), genes AKT (10%) e genes PI3K (17%) (20).

Atualmente estão em curso vários ensaios clínicos para avaliar a eficácia dos inibidores da mTOR, como o everolimus, temsirolimus e sirolimus como agentes únicos ou em combinação, para doentes com cancro da bexiga em estadio avançado (121, 128, 129).

As alterações da via (RTK)–MAPK incluem a ativação de FGFR3 (17%), mutação e amplificação de ERBB2 (9%), amplificação de EGFR (9%) e sobre-expressão de HER2 (ERBB2) em níveis semelhantes aos dos cancros da mama HER2 positivos. As alterações em FGFR3 e ERBB2 estão presentes no cancro da bexiga luminal (130). Já as alterações EGFR são frequentes no cancro da bexiga basal (130).

Enquanto os ensaios clínicos efetuados com fármacos que têm como alvo o FGFR, apresentaram resultados mistos (1.62/63), os ensaios com inibidores EGFR e ERBB2 não apresentaram resultados promissores (134).

O trastuzumab e o lapatinib (terapêutica-alvo HER2), ao contrário do observado no cancro da mama, não demonstraram benefício clínico significativo (1,74-76). Um estudo efetuado no âmbito do carcinoma gastroesofágico sugeriu que esta resistência pode estar relacionada com eventos oncogénicos secundários, como

alterações na via PI3K, capazes de produzir resistência intrínseca à terapêutica-alvo HER2 (1.77).

No caso dos tumores basais, que são potencialmente sensíveis a terapias-alvo de inibição do EGFR (118), formulou-se a hipótese de que os biomarcadores TEM, altamente expressos nos CBI basais (sobretudo o cluster IV TCGA), possam conferir resistência a estes fármacos. Os inibidores da histona deacetilase poderão ter interesse para combater esta resistência (131, 132, 133).

O TCGA identificou também mutações em genes reguladores de cromatina, numa frequência maior do que noutros cancros. Quatro destes modificadores epigenéticos estavam mutados em cerca de 15–25% dos doentes, incluindo KMT2D (27%), ARID1A (25%), KDM6A (24%) e EP300 (15%) (28), e podem também eles ser potenciais alvos de terapêutica-alvo (121, 128, 129).

Verificou-se ainda que os tumores luminais sobre expressam ERb (ESR2) e FOXA1 (20, 15, 30, 136). Um grupo de investigadores mostrou que o tamoxifeno (antagonista ER) inibe a proliferação e induz a apoptose nas células humanas de cancro da bexiga *in vitro* (137, 138). Já nos tumores basais da bexiga, os estudos que foram efetuados com o *mitotic kinesin inhibitor* AZD4877 e o docetaxel (139) mostraram que a sensibilidade a estes fármacos estava relacionada diretamente com expressão de p63, e que os cancros da bexiga basais com altos níveis de expressão de DNp63 e Myc, poderão ser especialmente sensíveis a estes agentes. O HIF-1 é um fator de transcrição que induz a expressão de VEGF, e está aumentado nos tumores basais (23). No âmbito de um ensaio clínico de fase II com *ddMVAC* e bevacizumab, os doentes com tumores basais não apresentavam habitualmente bons resultados (160). O Ramucirumab, um anticorpo monoclonal contra VEGF2, usado em segunda linha mostrou resultados promissores no tratamento de carcinoma urotelial avançado, em associação com docetaxel (140).

Fazer corresponder o perfil tumoral com um agente de terapêutica-alvo é uma tarefa complexa, uma vez que os tumores da bexiga têm frequentemente um largo espectro de co-mutações, variação de número de cópias e modificadores epigenéticos, que contribuem para heterogeneidade intratumoral (135). Alguns estudos preliminares mostraram diferenças espaciais e temporais nos padrões moleculares dos tumores, que também pode influenciar a resposta aos agentes de terapêutica-alvo, sendo que uma

possível biopsia tumoral poderá não englobar alterações importantes que indiquem resposta à terapêutica-alvo (1.47,48).

Estão a decorrer vários estudos, não só no cancro da bexiga, mas também noutros tipos de cancro, de forma a perceber as vantagens da terapêutica-alvo (157). Ensaio futuros irão possivelmente fornecer dados sobre estratégias eficazes para tratar os doentes de forma personalizada, nomeadamente no contexto peri-operatório, e identificar agentes eficazes em doentes seleccionados (161).

Os inibidores de *checkpoint* imune representam uma das áreas mais promissoras na terapêutica oncológica, tendo demonstrado respostas duradouras em vários cancros. Os alvos *major* são o CTLA4, PD-1 e PD-L1 (141). Estes fármacos têm mostrado nos últimos anos eficácia significativa e bons perfis de segurança no tratamento de cancro da bexiga avançado ou metastático (142, 143, 144, 145).

Após mais de 30 anos com avanços limitados na terapêutica do carcinoma urotelial (162), desde Maio de 2016, vários agentes bloqueadores do *checkpoint* imune que têm PD-1 e PD-L1 como alvos foram aprovados. O atezolizumab, pembrolizumab, nivolumab, avelumab e durvalumab foram aprovados para a terapêutica de 2ª linha depois da QT (após progressão) ou como 1ª linha em doentes não elegíveis para QT (142, 143, 146, 147, 148). São os primeiros fármacos aprovados pela FDA para o carcinoma urotelial depois da cisplatina em 1978 (162). As taxas de resposta global geralmente não ultrapassam os 30%, logo na melhor das hipóteses, 1 em 3 doentes tratados terá resposta (142, 143, 146, 147, 148). Identificar doentes que respondem a esta terapêutica é uma área de interesse, tendo por isso sido estudadas formas de o prever, como a expressão de PD-L1 e relação com os subtipos intrínsecos moleculares (162).

Alguns estudos referem que altos níveis de expressão de PD-L1 podem ser fatores preditivos de resposta à imunoterapia (143). Mas os dados mostram que estes fármacos têm também eficácia em doentes com tumores com baixa expressão de PD-L1 ou (157) mesmo inexistente (143). Atualmente, o papel da expressão de PD-1 e PD-L1 nas células imunes ou tumorais como biomarcador da resposta à imunoterapia permanece incerto, devido a resultados inconsistentes, o que se poderá dever ao uso de diferentes métodos e *cut-points* entre os vários estudos (142, 143, 144, 145), multiplicidade de anticorpos PD-L1 específicos, sistemas de pontuação e influência de

fatores específicos do doente, como a carga tumoral (150).

Devido aos diferentes níveis de infiltração celular imune observada nos diferentes subtipos de cancro da bexiga (39), foi sugerido que podia haver uma associação entre resposta à imunoterapia e os subtipos moleculares (38). No ensaio de fase II que levou a aprovação do atezolizumab, doentes cujos tumores pertenciam ao cluster II TCGA tinham mais benefício que os dos outros subtipos. Doentes com tumores papilares (cluster I) tinham pouco ou nenhum benefício (54). No entanto, a prevalência de células imunes PD-L1 era mais alta no cluster III (basal) (54, 144). Outros estudos referiram que a infiltração imune e a expressão de PD-L1 eram na verdade maiores no subgrupo *Claudin-Low* (corresponde ao Cluster IV TCGA), com um fenótipo TEM e uma elevada infiltração imune - tumores basais mesenquimais (151). O *update* TCGA mostrou grande expressão génica imune no subgrupo luminal imune (Cluster II) (39), o que se parece relacionar com o seu benefício clínico. A expressão de PD-L1 nos clusters basais era alta nas células imunes e células tumorais, sugerindo que outros fatores imunossupressores existem nestes subtipos que impedem a ativação das células T com a inibição da via PD-L1/PD-1 (143).

O atezolizumab teve máximo benefício nos tumores que pertencem a um subtipo que parece ser mais resistente à QT. Assim, se estes resultados forem validados, a imunoterapia com atezolizumab e a QT com cisplatina podem produzir benefício clínico numa população complementar de doentes (24)

Outro dado importante é que respostas foram registadas em todos os subtipos existentes, limitando o uso dos seus marcadores para prever a resposta à imunoterapia (162). No entanto, a expressão génica destes ensaios ainda não foi publicamente apresentada, e a metodologia para atribuir os clusters TCGA não foram revelados. Conclusões finais do impacto dos subtipos na resposta à imunoterapia não podem ser objetivadas (159).

A possibilidade de imunoterapia neoadjuvante ainda não está estabelecida para a terapêutica do carcinoma urotelial. Hipoteticamente, a imunoterapia poderá ser mais eficaz como neoadjuvante, em comparação com adjuvante, uma vez que é mais provável que uma maior carga de antígenos esteja presente se o tumor primário ainda está *in situ* (163). Um dos estudos que aponta para a vantagem desta modalidade foi feito com ratinhos no âmbito do cancro da mama metastático (152). Em humanos é

difícil conduzir estes ensaios, uma vez que é difícil justificar a não utilização de QT neoadjuvante em doentes elegíveis. No âmbito metastático, apenas 20% dos doentes atingem uma resposta objetiva à imunoterapia, por isso seria difícil adiar a cirurgia em prol de uma terapêutica sistémica que provavelmente não ira ajudar a maioria dos doentes. Já a toxicidade da imunoterapia é provavelmente menor, apesar de eventos graves relacionados com imunidade antes da cirurgia poderem comprometer a sua realização. Ensaio de fase II estão a investigar a segurança e capacidade de *downstaging* antes de cirurgia, de inibidores do checkpoint em combinação com GC ou usando múltiplos inibidores do checkpoint imune (163). A QT neoadjuvante poderá ter um grande impacto se a sua utilização puder ser guiada por biomarcadores preditivos, como os subtipos moleculares (15).

Conclusão

Traçar um perfil molecular e determinar marcadores genómicos associados ao cancro, está a tornar-se cada vez mais usual devido aos desenvolvimentos no âmbito da sequenciação de nova geração. Estes métodos podem fornecer ferramentas importantes que podem ajudar na deteção precoce de doenças, determinar sensibilidade à terapêutica, estratificação de risco, prognóstico e progressão de doença, ou mesmo ter importância para desenvolvimento de métodos de vigilância não invasiva.

No caso particular do cancro da bexiga, que conta com diferentes assinaturas moleculares, a compreensão da fisiopatologia e alterações moleculares da doença têm possibilitado nos últimos anos a investigação de novas hipóteses na sua abordagem. A integração dos biomarcadores genómicos, de transcrição ou imunes na prática clínica tem o potencial para melhorar a seleção terapêutica no cancro da bexiga, uma doença tão genómica e clinicamente heterogénea.

A identificação de marcadores e assinaturas moleculares permitiram a classificação do cancro da bexiga em vários subtipos moleculares, propostos por diferentes entidades. Tal como foi discutido, há evidência de que estes subtipos moleculares possam ter relação com o prognóstico e previsão de resposta à terapêutica, nomeadamente à terapêutica neoadjuvante e terapêutica dirigida, o que se revela especialmente importante para evitar que doentes que não responderão à terapêutica

sejam expostos a toxicidade que poderá comprometer o seu estado geral e terapêuticas posteriores.

Dadas as várias taxonomias existentes para os subtipos moleculares, e perante a evidência de sobreposição das várias classificações, será importante determinar quais as assinaturas que oferecem informação clínica mais relevante, e desenvolver um sistema de classificação consensual a larga escala. Será também importante desenvolver métodos que possam determinar o subtipo molecular do tumor de forma a que possa ser incorporada na prática clínica, usando técnicas convencionais de histopatologia e imunohistoquímica. Um dado importante é que ainda não há evidência de que pertencer a um certo subtipo molecular seja uma característica estável e intrínseca de um tumor. Os CBNI são propensos a recorrência, logo será importante realizar estudos longitudinais, e perceber se o subtipo é mantido na recorrência, tal como no subtipo das metástases (74).

Quanto à relação dos subtipos moleculares com a terapêutica, os estudos efectuados até agora identificam o subtipo molecular p53-like como resistência à QT neoadjuvante com cisplatina, e o subtipo molecular basal como o que mais beneficia com esta terapêutica, sendo o subtipo molecular que mostra o maior aumento na sobrevivência global. Por sua vez, o Cluster II da classificação TCGA parece ser o subtipo molecular com maior benefício da terapêutica alvo, com atezolizumab. Um dado importante é que os tumores do cluster II TCGA pertencem a um grupo de tumores que parece não ter benefício com a QT neoadjuvante, sendo estas duas populações complementares.

No entanto, todos os estudos realizados no âmbito da relação dos subtipos moleculares e terapêutica têm limitações importantes: como o número limitado de doentes incluídos, o facto de maioria dos dados genómicos e clínicos terem sido obtidos de forma retrospectiva, follow-up curto e heterogeneidade de esquemas de QT incluídos. Para validação futura será necessário o uso de esquemas de QT homogêneos em estudos de grande prospeção e vigilância (159).

Caso se introduza na prática clínica a decisão terapêutica com base na categorização pelos subtipos moleculares, esta irá representar uma revolução na urologia oncológica e na abordagem clínica da doença, que prometem aumentar a sobrevivência e qualidade de vida dos doentes.

Referências Bibliográficas

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R. *et al.* (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136(5):E359–E386.
2. Kamat A. M. *et al.* (2016) Bladder cancer. *Lancet* 388, 2796–2810.
3. Mahdavi N., Ghoncheh M., Pakzad R., Momenimovahed Z. and Salehiniya H. (2016) Epidemiology, incidence and mortality of bladder cancer and their relationship with the development index in the world. *Asian Pac. J. Cancer Prev* 17, 381–386.
4. Ferlay J. *et al.* (2013) GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11.
5. Svatek R. S. *et al.* (2014) The Economics of Bladder Cancer: Costs and Considerations of Caring for This Disease. *Eur. Urol* 66, 253–262.
6. Willis D. & Kamat, A. M. (2015) Nonurothelial bladder cancer and rare variant histologies. *Hematol. Oncol. Clin. North Am* 29, 237–252.
7. Humphrey P.A., Moch H., Cubilla A.L., Ulbright T.M., and Reuter V.E. (2016) The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs part B: prostate and bladder tumours. *Eur Urol* 70(1):106-119.
8. Smith A. B. *et al.* (2014) Muscle-invasive bladder cancer: evaluating treatment and survival in the National Cancer Data Base. *BJU Int* 114, 719–726.
9. Burger M. *et al.* (2013) Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur. Urol* 63, 234–241.
10. Edge S., Byrd D. and Compton C. (2010) *AJCC Cancer Staging Manual* 7th edn.
11. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures (2016). *Cancer.org*.
12. Kaufman D. S., Shipley W. U. and Feldman A. S. (2009) Bladder cancer. *Lancet* 374, 239–249.
13. Prout G., Marshall V. F. (1956) The prognosis with untreated bladder tumors. *Cancer* 9, 551–558.
14. Lerner S.P., McConkey D.J., Hoadley K.A., *et al.* (2016) Bladder Cancer Molecular Taxonomy: Summary from a Consensus Meeting. *Bladder Cancer* 2:37-47.
15. Choi W. *et al.* (2014) Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* 25, 152–165.
16. Blaveri E. (2005) Bladder cancer outcome and subtype classification by gene expression. *Clin Cancer Res* 11(11):4044–55.
17. Dadhania V. *et al.* (2016) Meta-analysis of the luminal and basal subtypes of bladder cancer and the identification of signature immunohistochemical markers for clinical use. *EBioMedicine* 12, 105–117.
18. McConkey D. J., Choi W. and Dinney C. P. N. (2014) New insights into subtypes of invasive bladder cancer: considerations of the clinician. *Eur. Urol* 66, 609–610.
19. Warrick J. I. *et al.* (2016) FOXA1, GATA3 and PPAR γ cooperate to drive luminal subtype in bladder cancer: a molecular analysis of established human cell lines. *Sci. Rep* 6, 3853.
20. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 507 (7492):315-322.
21. Van Batavia J. (2014) Bladder cancers arise from distinct urothelial sub-populations. *Nat Cell Biol* 16(10):982–91.
22. Lindgren D., Frigyesi A., Gudjonsson S., *et al.* (2010) Combined gene expression and genomic profiling define two intrinsic molecular subtypes of urothelial carcinoma and gene signatures for molecular grading and outcome. *Cancer Res* 70:3463-72.
23. Sjödaahl G. *et al.* (2012) A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clin. Cancer Res* 18, 3377–3386.
24. Choi W., Ochoa A., McConkey D.J., *et al.* (2017) Urothelial Cancer Genetic Alterations in the Molecular Subtypes of Bladder Cancer: Illustration in the Cancer Genome Atlas Dataset. *Eur Urol* 72:354-65.
25. Patschan, O. *et al.* (2015). A molecular pathologic framework for risk stratification of stage T1 urothelial carcinoma. *Eur. Urol* 68, 824–836.
26. Tsimberidou A.M. *et al.* (2014) Personalized medicine for patients with advanced cancer in the phase I program at MD Anderson: validation and landmark analyses. *Clin. Cancer Res* 20, 4827–4836.
27. Choi W., Czerniak B., Ochoa A. *et al.* (2014) Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol* 11(7):400–410.
28. Kurtova A.V., Xiao J., Mo Q., *et al.* (2015) Blocking PGE2-induced tumour repopulation abrogates bladder cancer chemoresistance. *Nature* 517:209-13.
29. McConkey D.J., Choi W., Dinney C.P. (2015) Genetic subtypes of invasive bladder cancer. *Curr Opin Urol* 25:449-58.
30. Damrauer J.S., Hoadley K.A., Chism D.D., *et al.* (2014) Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:3110-5.
31. Perou C. M., *et al.* (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752.
32. Hedegaard J. *et al.* (2016) Comprehensive transcriptional analysis of early-stage urothelial carcinoma. *Cancer Cell* 30, 27–42.
33. Sylvester R. J. *et al.* (2006) Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur. Urol* 49, 466–477.
34. Dyrskjöt L. *et al.* (2004) Gene expression in the urinary bladder: a common carcinoma *in situ* gene expression signature exists disregarding histopathological classification. *Cancer Res* 64, 4040–4048.
35. Babjuk M. *et al.* (2017) EAU Guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2016. *Eur. Urol* 71, 447–46.
36. Kiss B. *et al.* (2017) Her2 alterations in muscle-invasive bladder cancer: patient selection beyond protein expression for targeted therapy. *Sci. Rep* 7, 42713.
37. Korpai M., Lee E.S., Hu G., Kang Y. (2008) The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J. Biol. Chem* 283, 14910–14914.
38. McConkey D. J. *et al.* (2015) Therapeutic opportunities in the intrinsic subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North Am* 29, 377–394.
39. J. Kim R. *et al.* (2015) Invasive bladder cancer: genomic insights and therapeutic promise, *Clin. Cancer Res* 21 4514–4524.
40. Nguyen D. P. and Thalmann G. N. (2017) Contemporary update on neoadjuvant therapy for bladder cancer. *Nat. Rev. Urol* 14, 348–358

41. Lauss M. et al. (2012) DNA methylation analyses of urothelial carcinoma reveal distinct epigenetic subtypes and an association between gene copy number and methylation status. *Epigenetics* 7(8):858-67.
42. Aine M. et al. (2015) Integrative epigenomic analysis of differential DNA methylation in urothelial carcinoma. *Genome Med* 7(1):23.
43. Perou C.M. et al. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406(6797):747-52
44. Aine M., Eriksson P., Liedberg F. et al. (2015) Biological determinants of bladder cancer gene expression subtypes. *Sci Rep* 5:10957.
45. Lauss M., Ringner M., Höglund M. (2000) Prediction of stage, grade, and survival in bladder cancer using genome-wide expression data: a validation study. *Clin Cancer Res* 16(17):4421-33.
46. Sjö Dahl G., Eriksson P., Liedberg F. and Höglund M. (2017) Molecular classification of urothelial carcinoma: global mRNA classification versus tumour-cell phenotype classification. *J. Pathol* 242, 113-125.
47. Eich M.L., Dyrskjøt L. and Netto G.J. (2017) Toward personalized management in bladder cancer: the promise of novel molecular taxonomy. *Virchows Arch.* 1-10.
48. Clark P. E. et al. (2016) NCCN guidelines insights: bladder cancer, version 2.2016. *J. Natl Compr. Canc. Netw* 14, 1213-1224.
49. Yoder B.J., Skacel M. and Hedgepeth R. et al (2007) Re ex UroVy- sion testing of bladder cancer surveillance patients with equivo- cal or negative urine cytology: a prospective study with focus on the natural history of anticipatory positive Endings. *Am J Clin Pathol* 127(2):295-301.
50. Hajdinjak T. (2008) UroVysion FISH test for detecting urothelial cancers: meta-analysis of diagnostic accuracy and comparison with urinary cytology testing. *Urol Oncol* 26(6):646-651.
51. Stein J. P. et al. (2001) Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J. Clin. Oncol* 19, 666-675.
52. Leissner, J. et al. (2004) Extended radical lymphadenectomy in patients with urothelial bladder cancer: results of a prospective multicenter study. *J. Urol* 171, 139-144 (2004).
53. Vieweg, J., Gschwend, J. E., Herr, H. W. & Fair, W. R. The impact of primary stage on survival in patients with lymph node positive bladder cancer. *J. Urol* 161, 72-76.
54. Rosenberg B., VanCamp L. and Krigas T. (1965) Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205, 698-699.
55. Yagoda A. (1979) Phase II trials with *cis*- dichlorodiammineplatinum(II) in the treatment of urothelial cancer. *Cancer Treat. Rep* 63, 1565-1572.
56. Merrin C. (1978) Treatment of advanced bladder cancer with *cis*-diamminedichloroplatinum (II NSC 119875): a pilot study. *J. Urol* 119, 493-495.
57. Yagoda A. (1983) Phase II trials in patients with urothelial tumors: Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 11 (Suppl.), 9-12.
58. Yagoda A. (1987) Chemotherapy of urthoethelial tract tumours. *Cancer* (Suppl.) 60, 574-585.
59. Sternberg C. N. et al. (1985) Preliminary results of M-VAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) for transitional cell carcinoma of the urothelium. *J. Urol.* 133, 403-407.
60. Wallace D. et al. (1991) Neo- adjuvant (pre-emptive) cisplatin therapy in invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Br. J. Urol.* 67, 608-615.
61. Troner M., Birch R., Omura G.A., Williams S. (1987) Phase III comparison of cisplatin alone versus cisplatin, doxorubicin and cyclophosphamide in the treatment of bladder (urothelial) cancer: a Southeastern Cancer Study Group trial. *J Urol.* 137(4): 660-662.
62. Logothetis C.J., Dexeus F.H., Finn L., et al. (1990) A prospective randomized trial comparing MVAC and CISCA chemotherapy for patients with metastatic urothelial tumors. *J Clin Oncol.* 8(6):1050-1055.
63. Pollera C.F., Ceribelli A., Crecco M., Calabresi F. (1994) Weekly gemcitabine in advanced bladder cancer: a preliminary report from a phase I study. *Ann Oncol.* 5(2):182-184.
64. von der Maase H., Andersen L., Crino` L., Weinknecht S., Dogliotti L. (1999) Weekly gemcitabine and cisplatin combination therapy in patients with transitional cell carcinoma of the uro- thelium: a phase II clinical trial. *Ann Oncol.* 10(12):1461- 1465.
65. Moore M.J., Winquist E.W., Murray N., et al. (1999) Gemcitabine plus cisplatin, an active regimen in advanced urothelial cancer: a phase II trial of the National Cancer Institute of Canada Clin- ical Trials Group. *J Clin Oncol.* ;17(9):2876-2881.
66. von der Maase H., Hansen S.W., Roberts J.T., (2000) et al. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol.* 18(17):3068-3077.
67. von der Maase H., Sengelov L., Roberts J.T. et al. (2005) Long-term sur- vival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol.* 23(21):4602-4608.
68. Sternberg C.N., de Mulder P., Schornagel J.H., et al (2006); EORTC Genito-Urinary Cancer Group. Seven year update of an EORTC phase III trial of high-dose intensity M-VAC chemo- therapy and G-CSF versus classic M-VAC in advanced urothelial tract tumours. *Eur J Cancer.* 42(1):50-54.
69. Sternberg C.N., de Mulder P.H., Schornagel J.H. et al. (2001) European Organization for Research and Treatment of Cancer GenitO-urinary Tract Cancer Cooperative Group. Randomized phase III trial of higher dose-intensity methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin (MVAC) chemotherapy and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor versus classic MVAC in advanced urothelial tract tumors: European Organization for Research and Treatment of Cancer Protocol No. 30924. *J Clin Oncol.* 19(10):2638-2646.
70. Advanced Bladder Cancer Meta-analysis C. Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2003;361:1927-34.
71. Advanced Bladder Cancer Meta-analysis C. Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: update of a systematic review and meta-analysis of individual patient data advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration. *European urology.* 2005;48:202-5; discussion 5-6.
72. Grossman H.B., Natale R.B., Tangen C.M., Speights V.O., Vogelzang N.J., Trump D.L. et al. (2003) Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *The New England journal of medicine* 349:859-66.

73. International Collaboration of T, Medical Research Council Advanced Bladder Cancer Working P, European Organisation for R, Treatment of Cancer Genito-Urinary Tract Cancer G, Australian Bladder Cancer Study G, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials G, et al. International phase III trial assessing neoadjuvant cisplatin, methotrexate, and vinblastine chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: long-term results of the BA06 30894 trial. *J Clin Oncol.* 2011;29:2171-7.
74. Choi, W. et al (2017). Genetic Alterations in the Molecular Subtypes of Bladder Cancer: Illustration in the Cancer Genome Atlas Dataset. *European urology*, 72 3, 354-365.
75. Neoadjuvant cisplatin, methotrexate, and vinblastine chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: a randomised controlled trial. International collaboration of trialists. *Lancet* 1999;354:533- 40.
76. Zargar H., Espiritu P.N., Fairey A.S. *et al.* (2015) Multicenter assessment of neoadjuvant chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 67(2):241-9.
77. Dash A., Pettus J., Herr H.W., Bochner B.H., Dalbagni G., Donat S.M. *et al.* (2008) A role for neoadjuvant gemcitabine plus cisplatin in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: a retrospective experience. *Cancer.* 113:2471-7.
78. Plimack E.R., Hoffman-Censits J.H., Viterbo R. *et al.* (2014) Accelerated methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin is safe, effective, and efficient neoadjuvant treatment for muscle- invasive bladder cancer: results of a multicenter phase II study with molecular correlates of response and toxicity. *J Clin Oncol.* 32(18):1895-1901.
79. Choueiri T.K., Jacobus S., Bellmunt J. *et al.* (2014) Neoadjuvant dose-dense methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin with pegfilgrastim support in muscle-invasive urothelial cancer: pathologic, radiologic, and biomarker correlates. *J Clin Oncol.* 32(18):1889-1894.
80. Artigo 23
81. Plimack E.R., Hoffman-Censits J.H., Kutikov A. *et al.* (2014) Neoadjuvant dose-dense gemcitabine and cisplatin (DDGC) in patients (pts) with muscle-invasive bladder cancer (MIBC): final results of a multicenter phase II study [abstract]. *J Clin Oncol.* 32(15, suppl):4513.
82. Balar A.V., Iyer G., Milowsky M.I. *et al.* (2016) Multicenter prospective phase II trial of neoadjuvant (neo) dose dense gemcitabine and cisplatin (DD-GC) in patients (pts) with muscle-invasive bladder cancer (MIBC) [abstract]. *J Clin Oncol.* 34(2, suppl):436.
83. van de Putte E.E., Mertens L.S., Meijer R.P. *et al.* (2016) Neoadjuvant induction dose-dense MVAC for muscle invasive bladder cancer: efficacy and safety compared with classic MVAC and gemcitabine/cisplatin. *World J Urol* ;34(2):157-62.
84. Zargar H., Shah B.J., Fransen van de Putte E.E. *et al.* (2017) MP58-03 dose dense mvac prior to radical cystectomy: a retrospective multi-institutional experience *J Uro* 197(4):773.
85. Chang S.S., Boorjian S.A., Chou R. *et al.* (2016) Diagnosis and Treatment of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: AUA/ SUO Guideline. *J Urol* 196:1021-9.
86. Alfred Witjes J., Lebret T., Comparat E.M. *et al.* (2017) Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *Eur Urol* 71:462-75.
87. Porter M.P., Kerrigan M.C., Donato B.M., Ramsey S.D. (2011) Patterns of use of systemic chemotherapy for Medicare beneficiaries with urothelial bladder cancer. *Urol Oncol* 29(3):252-8.
88. Rosenblatt R., Sherif A., Rintala E. *et al.* (2012) Pathologic downstaging is a surrogate marker for efficacy and increased survival following neo- adjuvant chemotherapy and radical cystectomy for muscle-invasive urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 61(6):1229-38.
89. Sonpavde G., Goldman B.H., Speights V.O. *et al.* (2009) Quality of pathologic response and surgery correlate with survival for patients with completely resected bladder cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 115(18):4104-9.
90. Roghmann F., Trinh Q.D., Braun K. *et al.* (2014) Standardized assessment of complications in a contemporary series of European patients undergoing radical cystectomy. *Int J Urol* 21:143-9.
91. Shabsigh A., Korets R., Vora K.C. *et al.* (2009) De ning Early Morbidity of Radical Cystectomy for Patients with Bladder Cancer Using a Standardized Reporting Methodology. *Eur Urol* 55:164-74.
92. Johar R.S., Hayn M.H., Stegemann A.P. *et al.* (2013) Complications after robot-assisted radical cystectomy: Results from the international robotic cystectomy consortium. *Eur Urol* 64:52-7.
93. Donat S.M., Shabsigh A., Savage C. *et al.* (2009) Potential impact of postoperative early complications on the timing of adjuvant chemotherapy in patients undergoing radical cystectomy: a high-volume tertiary cancer center experience. *Eur Urol* 55(1):177-186.
94. Schiffmann J., Sun M., Gandaglia G. *et al.* (2016) Suboptimal use of neoadjuvant chemotherapy in radical cystectomy patients: A population-based study. *Can Urol Assoc J* 10:E82-6.
95. Burger M., Mulders P. and Witjes W. (2012) Use of neoadjuvant chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer is low among major European centres: results of a feasibility questionnaire. *Eur Urol* 61:1070-1.
96. David K. A., Milowsky M. I., Ritchey J., Carroll P. R. and Nanus D. M. (2007) Low incidence of perioperative chemotherapy for stage III bladder cancer 1998 to 2003: a report from the National Cancer Data Base. *J. Urol* **178**, 451-454.
97. Raj G.V. *et al.* (2011) Contemporary use of perioperative cisplatin-based chemotherapy in patients with muscle- invasive bladder cancer. *Cancer* **117** 276-282.
98. Fedeli U., Fedewa S. A. and Ward E. M. (2011) Treatment of muscle invasive bladder cancer: evidence from the national cancer database, 2003 to 2007. *J. Urol* **185**, 72-78.
99. Herr H. W. *et al.* (2007) Defining optimal therapy for muscle invasive bladder cancer. *J. Urol* **177**, 437-443.
100. Cowan, N. G. *et al.* (2014) Neoadjuvant chemotherapy use in bladder cancer: a survey of current practice and opinions. *Adv. Urol.* <http://dx.doi.org/10.1155/2014/746298>.
101. Sanchez-Ortiz R. F. *et al.* (2003) An interval longer than 12 weeks between the diagnosis of muscle invasion and cystectomy is associated with worse outcome in bladder carcinoma. *J. Urol* **169**, 110.
102. Mahmud S. M., Fong, B., Fahmy N., Tanquay, S. and Aprikian A. G. (2006) Effect of preoperative delay on survival in patients with bladder cancer undergoing cystectomy in Quebec: a population based study. *J. Urol* **175**, 78-83.
103. Reardon Z.D., Patel S.G., Zaid H.B., et al. (2015) Trends in the use of perioperative chemotherapy for localized and locally advanced muscle-invasive bladder cancer: a sign of changing tides. *Eur Urol* 67(1):165-170.
104. Lavery H.J., Stensland K.D., Niegisch G., Albers P., Droller M.J. (2014) Pathological T0 following radical cystectomy with or without neoadjuvant chemotherapy: a useful surrogate. *J Urol* 191(4):898- 906.

105. Culp S.H., Dickstein R.J., Grossman H.B. *et al.* (2014) Refining patient selection for neoadjuvant chemotherapy before radical cystectomy. *J Urol* 191(1):40–7.
106. Black P. *et al.* (2014) Neoadjuvant chemotherapy in patients with muscle-invasive bladder cancer: which patients benefit? *Eur Urol* 2013;64:355–7. *Eur Urol* 65(1): e8–9.
107. Fleischmann A., Thalmann G.N., Perren A. *et al.* (2014) Tumor regression grade of urothelial bladder cancer after neoadjuvant chemotherapy: a novel and successful strategy to predict survival. *Am J Surg Pathol* 38:325–32.
108. Aoun F., Kourie H.R., Artigas C., Roumeguère T. (2015) Next revolution in molecular theranostics: personalized medicine for urologic cancers. *Future Oncol* 11,2205–2219.
109. Als A.B., Dyrskjot L., von der Maase H. *et al.* (2007) Emmprin and Survivin Predict Response and Survival following Cisplatin-Containing Chemotherapy in Patients with Advanced Bladder Cancer. *Clin Cancer Res* 13:4407–14.
110. Hemdan T., Malmström P.U., Jahnson S. *et al.* (2015) Emmprin expression predicts response and survival following cisplatin containing chemotherapy for bladder cancer: A validation study. *J Urol* 194:1575–81.
111. Ishida S., Lee, J., Thiele D. J. and Herskowitz I. (2002) Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 14298–302.
112. Song I.S. *et al.* (2004) Role of human copper transporter Ctr1 in the transport of platinum- based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells. *Mol. Cancer Ther* 3, 1543–1549.
113. Kilari D. *et al.* (2016) Copper Transporter-CTR1 Expression and Pathological Outcomes in Platinum-treated Muscle-invasive Bladder Cancer Patients. *Anticancer Res* 36, 495– 501.
114. Kiss B. *et al.* (2015) Bcl-2 predicts response to neoadjuvant chemotherapy and is overexpressed in lymph node metastases of urothelial cancer of the bladder. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig* 33, 166.e1-166.e8.
115. Nomura S. *et al.* (2015) Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 2 (DYRK2) as a novel marker in T1 high-grade and T2 bladder cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy. *BMC Urol* 15, 53.
116. Sjö Dahl, K. *et al.* (2013) Toward a molecular pathologic classification of urothelial carcinoma, *Am. J. Pathol.* 183 681–691.
117. Plimack E.R. *et al.* (2015) Defects in DNA Repair Genes Predict Response to Neoadjuvant Cisplatin-based Chemotherapy in Muscle-invasive Bladder Cancer. *European urology* 68:959-67.
118. Allen, E. M. V. *et al.* (2014) Somatic ERCC2 mutations correlate with cisplatin sensitivity in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Cancer Discov* 4, 1140–1153.
119. Esserman L. J. *et al.* (2012) Chemotherapy response and recurrence-free survival in neoadjuvant breast cancer depends on biomarker profiles: results from the I-SPY 1 TRIAL (CALGB 150007/150012; ACRIN 6657). *Breast Cancer Res. Treat* 132, 1049–1062 .
120. Kim J. *et al.* (2016) Somatic ERCC2 mutations are associated with a distinct genomic signature in urothelial tumors. *Nat. Genet* 48, 600–606.
121. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02177695> (2017).
122. Lee J. K. *et al.* (2007) A strategy for predicting the chemosensitivity of human cancers and its application to drug discovery. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 13086–13091.
123. Smith S. C. *et al.* (2011) Use of yeast chemigenomics and COXEN informatics in preclinical evaluation of anticancer agents. *Neoplasia* 13, 72–80.
124. McConkey D.J., Choi W. *et al* (2016) A prognostic gene expression signature in the molecular classification of chemotherapy-naïve urothelial cancer is predictive of clinical outcomes from neoadjuvant chemotherapy: a phase 2 trial of dose-dense methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin with bevacizumab in urothelial cancer, *Eur. Urol.* 69 855–862
125. Seiler R., Ashab H.A., Erho N. *et al.* (2017) Impact of Molecular Subtypes in Muscle-invasive Bladder Cancer on Predicting Response and Survival after Neoadjuvant Chemotherapy. *Eur Urol*.
126. Mak M.P, Tong P., Diao L. *et al.* (2016) A patient-derived, pan-cancer EMT signature identifies global molecular alterations and immune target enrichment following epithelial-to-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res* ;22:609–20
127. Donsky, H., Coyle, S., Scosyrev, E. and Messing, E. M. (2014) Sex differences in incidence and mortality of bladder and kidney cancers: national estimates from 49 countries. *Urol. Oncol.* 32, 40.e23–40.e31.
128. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01215136?term=01215136&rank=1> (2017).
129. 161. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/>
130. Advanced Bladder Cancer Overview Collaboration. Neoadjuvant chemotherapy for invasive bladder cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;(2):CD005246.
131. Pouessel D., Bastuji-Garin S., Houédé N. *et al.* (2017) Adjuvant Chemotherapy After Radical Cystectomy for Urothelial Bladder Cancer: Outcome and Prognostic Factors for Survival in a French Multicenter, Contemporary Cohort. *Clin Genitourin Cancer* 15:e45-e52.
132. Boström P.J., Mirtti T., van Rhijn B. *et al.* Benefit of Adjuvant Chemotherapy and Pelvic Lymph Node Dissection in pT3 and Node Positive Bladder Cancer Patients Treated with Radical Cystectomy. *Bladder Cancer* 2016;2:263-72.
133. Dorff T.B., Tsao-Wei D., Miranda G., *et al.* (2009) Adjuvant chemotherapy for locally advanced urothelial carcinoma: an overview of the USC experience. *World J Urol* 27:39-44.
134. Sonpavde G. (2010) Second-line systemic therapy and emerging drugs for metastatic transitional-cell carcinoma of the urothelium. *Lancet Oncol* 11(9):861–70.
135. Plimack E.R. and Geynisman D.M. (2016) Targeted therapy for metastatic urothelial cancer: a work in progress. *J Clin Onco* 34(18):2088–2092.
136. Rebouissou S. (2014) EGFR as a potential therapeutic target for a subset of muscle- invasive bladder cancers presenting a basal-like phenotype. *Sci Transl Med* 6(244):244ra91.
137. Hoffman K.L., Lerner S.P., Smith C.L. (2013) Raloxifene inhibits growth of RT4 urothelial carcinoma cells via estrogen receptor-dependent induction of apoptosis and inhibition of proliferation. *Horm Cancer* ;4(1):24–35.
138. Shen S.S. (2006) Expression of estrogen receptors-alpha and -beta in bladder cancer cell lines and human bladder tumor tissue. *Cancer* 106(12):2610–6.

139. Marquis L. (2012) p63 expression correlates with sensitivity to the Eg5 inhibitor ZD4877 in bladder cancer cells. *Cancer Biol Ther* 13(7):477–86.
140. Petrylak D.P., Tagawa S.T., Kohli M. *et al.* (2016) Docetaxel as mono- therapy or combined with ramucirumab or icrucumab in second-line treatment for locally advanced or metastatic urothelial carcinoma: an open-label, three-arm, randomized controlled phase II trial. *J Clin Oncol* 34(13):1500-1509.
141. Lerner S. P. *et al.* (2016) Summary and recommendations from the National Cancer Institute’s clinical trials planning meeting on novel therapeutics for non- muscle invasive bladder cancer. *Bladder Cancer* 2, 165–202.
142. Sharma P., Retz M., Siefker-Radtke A. *et al.* (2017) Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 18:312-22.
143. Rosenberg J.E., Hoffman-Censits J., Powles T. *et al.* (2016) Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* 387:1909-20.
144. Balar A.V., Galsky M.D., Rosenberg J.E. *et al.* (2017) Atezolizumab as rst-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma:a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* 389:67-76.
145. Plimack E.R., Bellmunt J., Gupta S. *et al.* (2017) Safety and activity of pembrolizumab in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-012): a non- randomised, open-label, phase 1b study. *Lancet Oncol* 18:212-20.
146. Apolo A.B., Infante J.R., Balmanoukian A. *et al.* (2017) Avelumab, an anti- programmed death-ligand 1 antibody, in patients with refractory metastatic urothelial carcinoma: results from a multicenter, phase 1b study. *J Clin Oncol* [JCO2016716795].
147. Bellmunt J., de Wit R., Vaughn D.J. *et al.* (2017) Pembrolizumab as second- line therapy for advanced urothelial carcinoma. *N Engl J Med* 376(11):1015–26.
148. Massard C., Gordon M.S., Sharma S. *et al.* (2016) Safety and efficacy of durvalumab (MEDI4736), an anti-programmed cell death ligand-1 immune checkpoint inhibitor, in patients with advanced urothelial bladder cancer. *J Clin Oncol* 34(26): 3119–25.
149. Masucci G.V. *et al.* (2016) Validation of biomarkers to predict response to immunotherapy in cancer: volume I — pre-analytical and analytical validation. *J. Immunother. Cancer* 4, 76.
150. Sacher A. G., Gandhi L. (2016) Biomarkers for the clinical use of PD-1/PD-L1 inhibitors in non-small-cell lung cancer. *JAMA Oncol* 2, 1217.
151. Kardos J. *et al.* (2016) Claudin-low bladder tumors are immune infiltrated and actively immune suppresses, *JCI Insight* 1 <http://dx.doi.org/10.1172/jci.insight.85902>.
152. Liu J., Blake S.J., Yong M.C. *et al.* (2016) Improved efficacy of neoadjuvant compared to adjuvant immunotherapy to eradicate metastatic disease. *Cancer Discov* 6:1382-99.
153. Comp  rat E. *et al* (2018) A Practical guide to bladder cancer pathology. *Nat Rev Urol* 15(3):143-154
154. Funt S.A., Rosenberg J.E. (2016) Systemic, perioperative management of muscle-invasive bladder cancer and future horizons. *Nat Rev Clin*
155. Buttiglieri, C. *et al* (2017) Molecular biomarkers to predict response to neoadjuvant chemotherapy for bladder cancer, *Cancer Treatment Reviews Cancer Treatment Reviews*.
156. Groenendijk, F. H. *et al.* (2016) ERBB2 mutations characterize a subgroup of muscle-invasive bladder cancers with excellent response to neoadjuvant chemotherapy. *Eur. Urol.* 69, 384–388.
157. Felsenstein K.M., Theodorescu D. (2018) Precision medicine for urothelial bladder cancer: update on tumour genomics and immunotherapy. *Nat Rev Urol* 15(2):92-111.
158. Pradere B. *et al.* (2017) Peri-operative chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: status-quo in 2017. *Transl Androl Urol.* 6:1049-1059.
159. Wezel, F., Vallo, S., and Roghmann, F. (2017). Do we have biomarkers to predict response to neoadjuvant and adjuvant chemotherapy and immunotherapy in bladder cancer? *Translational andrology and urology*.
160. McConkey, D.J., Choi, W., Ochoa, A.E., Siefker-Radtke, A.O., Czerniak, B.A. and Dinney, C.P. (2015). Therapeutic opportunities in the intrinsic subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Hematology/oncology clinics of North America*, 29 2, 377-94, x-xi.
161. Sanli, O.M. *et al* (2016). Bladder cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 3.
162. Giridhar, K., & Kohli, M. (2017). Management of Muscle-Invasive Urothelial Cancer and the Emerging Role of Immunotherapy in Advanced Urothelial Cancer. *Mayo Clinic proceedings*, 92 10, 1564-1582.
163. Hermans, T.J. *et al* (2017). Neoadjuvant treatment for muscle-invasive bladder cancer: The past, the present, and the future. *Urologic oncology*.